

大豆共生固氮在农业减肥增效中的贡献及应用潜力

李欣欣, 许锐能, 廖红

(福建农林大学 根系生物学研究中心/海峡联合研究院 福建 福州 350002)

摘要: 近年来, 过度施用氮肥对农业生态环境造成了严重破坏。因此, 有必要挖掘和寻求其它氮素来源。生物固氮是固氮微生物将空气中的分子态氮还原成氨的过程。其中, 豆科植物-根瘤菌共生固氮占生物固氮量的60%以上, 对农业生产具有重要的作用。大豆是我国主要的蛋白质和油料作物, 也是农业生产中优良的轮作换茬和间套种作物。因此, 充分发挥大豆的生物固氮作用, 对减肥增效及发展环境友好型可持续生态农业意义重大。文章概述了生物固氮的生态效益、大豆生物固氮对农业生产的贡献潜力、以磷增氮机制及存在的问题等, 以为农业减肥增效及国内大豆产业提供一些可参考的途径和依据。

关键词: 大豆; 根瘤菌; 生物固氮; 减肥增效; 可持续性生态农业

中图分类号: S565.1 **文献标识码:** A **DOI:** 10.11861/j.issn.1000-9841.2016.04.0531

Contributions of Symbiotic Nitrogen Fixation in Soybean to Reducing Fertilization While Increasing Efficiency in Agriculture

LI Xin-xin, XU Rui-neng, LIAO Hong

(Root Biology Center, Haixia Institute of Science and Technology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: In recent years, excess nitrogen (N) fertilization caused severe damage to agro-ecology. Therefore, it is anxious to excavate and seek other N sources for plant growth and development. Biological nitrogen fixation (BNF) is a process in which atmospheric nitrogen (N_2) is converted into ammonia by N_2 fixation bacteria. Among them, symbiotic N_2 fixation by legumes with rhizobia fixes more than 60% of the amount of BNF, which plays important roles in agricultural production. Soybean is not only one of the major protein and oil crops, but also an excellent crop in rotation and intercropping systems. Therefore, giving full play to the BNF in soybean could bring great significance to reduce fertilization while increasing efficiency, and developing environmental friendly and sustainable eco-agriculture. This paper summarized the ecological benefits of BNF, contributions of soybean BNF in agriculture production, the mechanisms of P promoting N nutrition as well as its problems, so as to provide some strategies and basis for revival of domestic soybean production, and reducing fertilization while increasing efficiency in agriculture.

Keywords: Soybean; Rhizobia; Biological nitrogen fixation; Reducing fertilization while increasing efficiency; Sustainable eco-agriculture

大豆起源于中国,富含蛋白质、脂肪和多种维生素,在人类食品结构中占有重要的地位。近年来,随着人口数量的增加和畜牧业的飞速发展,我国对大豆的需求也日益剧增(图1)。然而,国内大豆供求严重失衡。从1996年开始进口大豆,到2000年成为世界上最大的大豆进口国以来,我国大豆进口量一直呈现逐年攀升的趋势(图1)。2015年我国大豆进口量达到8165万t。因此,为满足我国对大豆消费的巨大需求,有必要大力发展大豆产业。

农田生态系统中氮的循环和平衡过程是影响农业生产力的主要因素之一。随着人口数量的不断增加,现代农业面临巨大挑战。施肥成了农户惯用的增产方式。如图1所示,我国化肥总投入正在

逐年增加。然而,粮食产量增长缓慢,甚至出现增肥不增产的现象。其中,氮肥的施用量约占总施肥量的2/3,利用率不足40%。过量施用的氮肥由于氨挥发、反硝化等产生的气体排放(NH_3 , NO_x 和 N_2O),对空气造成严重污染;而氮淋失进入水体,使江河湖泊的富营养化也日趋严重^[1-4]。因此,挖掘和利用土壤氮素来源的其它有效途径,例如生物固氮,对减肥增效和保护生态环境至关重要。

大豆能够与根瘤菌共生,形成根瘤而进行生物固氮反应,是农业生产中一种优良的轮作换茬和间套种作物;具有减肥增产、培肥土壤、增加复种指数等效益。研究发现,豆科植物与谷物作物如玉米、小麦和大麦等间作,促进了氮从豆科植物向非豆科

收稿日期: 2016-02-11

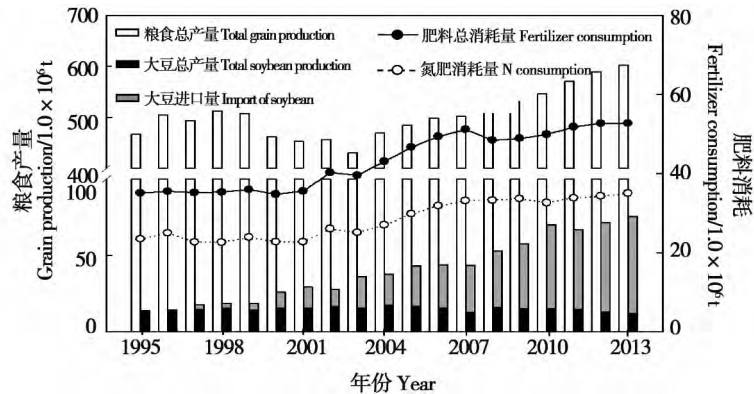
基金项目: 国家自然科学基金(U1301212)。

第一作者简介: 李欣欣(1984-),女,博士,副教授,主要从事大豆生物固氮生理与分子机制的研究。E-mail: lixinxin0476@163.com。

通讯作者: 廖红(1969-),女,博士,教授,主要从事作物根系形态构型与养分高效的遗传改良研究。E-mail: hliao@fafu.edu.cn。

植物的转移,在减少施肥量的情况下,增加了谷物作物的产量并改变了土壤中微生物群落,改善了土壤氮营养状况^[5-9]。大豆与经济作物茶树间作,能有效促进茶树生长,增加茶叶产量,同时改善植物生长的小气候,减少病虫害的发生^[10]。因此,在2015年“国务院办公厅关于加快转变农业发展方式的意见”第十三条中指出:大力推广豆科作物的轮

作、间作和套作模式;重点在我国粮食主产区推广不同作物与大豆的轮作、间作和套作种植(http://www.gov.cn/zhengce/content/2015-08/07/content_10057.htm)。由此可见,大豆在农业生产中发挥着不可替代的作用,大豆生物固氮的利用对推动生态农业的可持续发展等方面具有深远意义。



图中国内粮食产量数据来源: <http://www.stats.gov.cn/>; 大豆生产及进口量数据来源: <http://www.fao.org/>; 肥料消耗数据来源: <http://www.fertilizer.org/Statistics/>。

The domestic grain production data in this figure released at website: <http://www.stats.gov.cn/>; Soybean production and import data released at website: <http://www.fao.org/>; Fertilizer consumption data released at website: <http://www.fertilizer.org/Statistics/>。

图1 国内粮食产量、大豆生产及进口量、肥料消费量的变化趋势(1995-2013)

Fig. 1 The tendency of domestic grain and soybean production, soybean import, along with annual consumption of total and N fertilizers over the period from 1995 to 2013

1 大豆生物固氮在农业生态系统中的作用

生物固氮是指固氮微生物将空气中的分子态氮还原成氨,为植物或微生物生长提供氮源的过程^[11]。统计发现,全球固氮总量的70%来源于生物固氮,是地球上最大规模的天然氮肥工厂(FAO, 1995; <http://faostat.fao.org/>)。生物固氮分为自生固氮、联合固氮和共生固氮3个系统^[12-13]。其中,豆科植物-根瘤菌形成的共生固氮是3种固氮形式中固氮效率最高的体系,约占生物固氮总量的60%以上。

已有研究表明, N_2O 的释放与土壤条件及土壤 NH_4^+ 和 NO_3^- 浓度密切相关。因此,农田中过度施用氮肥势必增加 N_2O 释放的风险^[15]。然而,生物固氮的利用可以显著降低温室气体 N_2O 的释放。Huang等^[16]发现玉米与豆科植物间作,土壤 N_2O 的含量显著低于玉米单作。其中,与大豆间作的土壤 N_2O 排放量,在2010年和2011年分别降低了22.6%和

48.8%,是间作系统中效果最明显的豆科作物。此外,间作系统还显著提高了作物对土壤养分的吸收,阻止了氮和钾淋失到深层土壤^[17-18],减少其对水体的污染。

利用豆科植物接种根瘤菌能够改良、修复土壤,丰富根际微生物群落,肥地养地。通过分离矿区植物的根瘤菌菌株,发现该菌株对 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 和 Zn^{2+} 等均有较高的耐受性。三叶草接种具有重金属抗性的根瘤菌,与非接种的植株相比,能够提高其在重金属污染介质中的生物量和氮含量^[19-20],暗示可通过种植豆科植物、接种耐重金属毒性的根瘤菌,来修复重金属污染土壤。

综上所述,豆科植物生物固氮的利用,的确对降低大气、土壤和河流等的污染具有突出贡献。据统计,大豆是农业生态系统中,共生固氮量最多的豆科作物(表1)^[14]。因此,充分发挥豆科植物尤其是大豆的生物固氮作用,对生态农业的可持续发展具有重要意义。

表 1 不同豆科植物生物固氮的比较分析^[14]

Table 1 Comparison analysis of biological nitrogen fixation by different legumes

豆科植物 Legume	面积 Area /Mha	植株氮含量 Crop N /Tg	生物固氮百分率 Plant N derived from N ₂ fixation /%	生物固氮量 Crop N fixed /Tg
菜豆 Common bean	25.1	1.45	40	0.58
红豆 Cowpea	9.2	0.37	63	0.23
鹰嘴豆 Chickpea	10.4	0.96	63	0.60
豌豆 Pea	6.6	0.90	63	0.57
小扁豆 Lentil	4.1	0.33	63	0.21
蚕豆 Fababean	2.7	0.38	75	0.29
落花生 Groundnut	23.4	3.03	68	2.06
大豆 Soybean	93.4	24.17	68	16.44

生物固氮量 = 植株含氮量 × 生物固氮百分率。表中数据修改自 Herridge 等^[14]。

Biological nitrogen fixation = Nitrogen content of plant × Biological nitrogen fixation percent. Data in the table is modified from Herridge, et al^[14].

2 大豆生物固氮对农业生产的作用

2.1 接种根瘤菌提高土壤氮利用率

大豆的高效生物固氮能力对减少氮肥投入和增加大豆产量贡献突出。接种根瘤菌可以增加大豆的根瘤个数、提高固氮能力和植株氮营养。在巴西,自2003年田间成功应用高效根瘤菌菌肥以来,大豆增产主要依靠生物固氮^[21-22]。Hungria 等^[23]通过多年的田间试验,比较分析了生物固氮和施用氮肥对大豆增产的效果。结果发现,不施氮肥接种根瘤菌显著促进了大豆结瘤固氮,平均增产 127 kg·hm⁻²;而当施入 200 kg·hm⁻²的氮肥时,不仅不增产还显著抑制了大豆生物固氮,提高了农业成本并造成资源浪费。在孟加拉国,大豆接种根瘤菌 BARIRGm901 在不施氮肥条件下,能显著增加根瘤数、提高固氮效率、增加大豆荚数和大豆籽粒产量^[24]。而在我国东北的田间试验中也表明,接种高效根瘤菌剂能够达到全面增产的效果。与常规施肥的对照组相比,大豆产量增加了 92%^[25]。

2.2 大豆间作对农业生产的作用

大豆间作系统的应用,在氮转移和改良土壤结构方面具有重要作用。大豆与玉米间作,玉米根系形态特征、根系活力以及磷酸酶活性均显著高于单作。同时,间作玉米对氮的吸收量较单作高 37.0%,氮损失和氮挥发分别降低了 15.4% 和 1.2%^[26]。在酸性贫瘠土壤中,利用大豆间作种植,显著增加了土壤碱解氮含量。将间作种植的大豆秸秆回田后,土壤 pH 明显上升、交换性铝的含量显著下降。同时,大豆秸秆回田后土壤有机质含量比种植大豆前和对照分别提高了 8.3% 和 10.0%^[10]。可见,充分发挥大豆生物固氮的作用,对减少化肥用量、增加产量、肥地养地和降低环境污染等均具有重要的作用。

2.3 大豆生物固氮提高磷效率的潜力

田间试验表明,接种高效根瘤菌不仅使大豆氮含量增加了 85%,而且使植株的磷含量增加了 95%^[25],说明大豆接种高效根瘤菌具有同时提高植株氮效率和磷效率的潜力。磷是根瘤生长发育必需的大量营养元素。在豆科作物种植中长期以来就存在“以磷增氮”的措施。即适量施用磷肥,可促进豆科作物结瘤固氮,提高氮效率^[27];另一方面,根瘤共生固氮是高耗能过程,所需能量由三磷酸腺苷(ATP)直接提供。据报道,根瘤每固定 1 mol 的氮需要消耗 16 mol ATP^[28],而磷营养状况显著影响 ATP 的合成。因此,根瘤固氮对磷的需求较高,供磷水平的高低势必影响生物固氮效率。磷在土壤中易被固定而难以移动,其有效性低已成为农业生产中抑制大豆根瘤生长、降低根瘤固氮能力的主要因素之一^[29]。已有研究表明,豆科植物在结瘤过程中也存在一些适应低磷胁迫、提高磷效率的机制。Qin 等^[30]通过纯培养试验证明,高效根瘤菌菌株本身能形成溶磷圈,活化基质中的难溶态无机磷;根瘤菌进一步侵染宿主根系形成的共生根瘤能够分泌 H⁺ 和有机酸,进而活化根际土壤难溶磷,促进植株对磷的吸收、改善磷效率。在分子机制方面,低磷可调控根瘤特异基因的表达。例如,低磷增强大豆高亲和力磷转运子 *GmPT5* 在根瘤中的表达,从而促进磷从根系到根瘤中的运转,满足其对磷的需求^[25](图 2);另一方面,调控参与结瘤相关基因的表达,促进根瘤发育,亦可提高大豆的氮、磷效率。例如,过表达一个细胞壁 β-扩张蛋白基因, *GmEX-PB2*(图 2),可通过松弛细胞壁的直接调控途径来增加根瘤菌侵染线形成数量、加快根瘤原基、根瘤早期维管束(NVB 和 NVT)的发育,从而增加根瘤的数量和重量;还可通过调控根构型,增加根毛区长度及根毛密度的间接调控途径来扩大根瘤菌与

大豆根系的接触面积,进而促进大豆结瘤以及提高固氮酶活性等,最终能够增加大豆在高、低磷条件下的生物量^[31]。

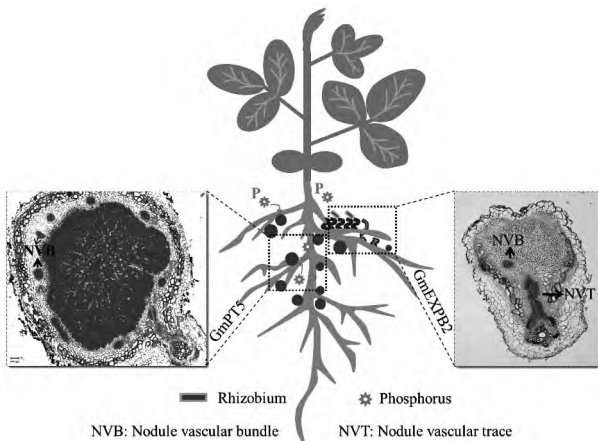


图2 大豆根瘤发育及根瘤从根系中获取磷的分子机制
Fig. 2 Molecular mechanism of root nodule development and the acquirement of phosphorus from root to nodule in soybean

3 问题与展望

3.1 存在的问题

挖掘大豆生物固氮潜力并应用于农业生产,对降低农业成本、提高大豆产量和维护生态环境均具有重要意义。然而,我国大豆种植模式中对生物固氮的利用和推广,还存在一定的局限。主要存在如下问题:

(1) 国内高效根瘤菌菌剂匮乏。虽然土壤中含有大量的土著根瘤菌,但大部分有效性较低或宿主专一性不高,易形成无效根瘤。此类根瘤固氮效率较低或几乎没有固氮能力,会消耗宿主大量的碳水化合物和矿质养分,不利于豆科植物的生长。高效根瘤菌剂需要同时具有宿主匹配性高、固氮能力强,能够适应当地土壤条件和较强的竞争能力等。虽有大量研究报道指出,国内已分离纯化了多种大豆根瘤菌菌株^[32-34];但是符合上述条件的高效根瘤菌剂,并在农业生产应用中具有提高大豆生物固氮效率的实例却比较少见。

(2) 人工接种技术滞后。制备高效根瘤菌菌剂后需要配合人工接种技术。目前,菌剂拌种是进行田间试验时较常用的接种方法,大豆种子携带菌剂而显著增加了土壤中根瘤菌数量,继而能提高大豆根瘤数和固氮效率。然而,此技术并未得到广大农户的青睐。经调查发现,黑龙江省每年大豆接种根瘤菌的面积还不到其播种面积的1%,主要是由于没有既可以配合大规模的机械化操作,又可以避免与农药种衣剂相矛盾的商业化高效根瘤菌接种剂及相应的施用技术指导^[35]。同时,根瘤菌剂拌种

的方法需要制备大量的接种剂,摇菌过程要严格避免杂菌滋生,还要保持根瘤菌活性,所以有必要推动高效固氮生物肥料的研究和推广。

(3) 缺乏合理的养分管理措施。根瘤的生长不仅受到氮素,还受到磷及微量元素的影响。大量施氮,促进大豆光合产物向根系分配,降低其向根瘤的转运而影根瘤发育,从而显著降低大豆根瘤数目和固氮酶活性^[36]。然而,完全不施氮肥亦不能满足大豆的生长发育所需,特别是根瘤有效固氮前生长发育的需求。此外,根瘤固氮也是一个高能耗过程,需要充足的磷素营养。在农业生产中,豆科作物的种植亦存在“以磷增氮”的现象。并且,根瘤的正常发育及高效固氮,也需要适量的铁、钼和锌等微量元素。因此,将高效根瘤菌应用于田间生产实践必须与合理的养分管理措施相结合,即人工接种高效根瘤菌的同时应适量施用氮、磷及铁锌等肥料,提高大豆生物固氮效率,以达到减肥增产的目的。

3.2 展望

从生理及生产应用的角度来讲,由于大豆共生固氮的高效性,将根瘤菌接种技术应用于农业生产势必带来减肥增产的效果。因此,在农业生产中大力发展和利用大豆间套作或轮作,争取大豆与其它作物双高产具有重要的应用前景;从分子生物学的角度来讲,科学家们一直在探索大豆高效结瘤固氮的机理,并取得了一定的成果。然而,在根瘤菌侵染过程、根瘤发育、养分在菌体与宿主之间转移等方面的机制还需要进一步挖掘。这些基础理论研究有助于突破限制固氮效率的瓶颈,对提高大豆固氮效率、减肥增产具有重要的指导意义。

参考文献

- [1] Zhang F S, Chen X P, Vitousek P. An experiment for the world [J]. *Nature*, 2013, 497: 33-35.
- [2] Liu X J, Zhang F S. Nitrogen fertilizer induced greenhouse gas emissions in China [J]. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, 2011, 3 (5): 407-413.
- [3] Liu X J, Ju X T, Zhang Y, et al. Nitrogen deposition in agroecosystems in the Beijing area [J]. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 2006, 113 (1-4): 370-377.
- [4] Liu X J, Zhang Y, Han W X, et al. Enhanced nitrogen deposition over China [J]. *Nature*, 2013, 494: 459-463.
- [5] Zhang Y, Liu J, Zhang J, et al. Row ratios of intercropping maize and soybean can affect agronomic efficiency of the system and subsequent wheat [J]. *PLoS One*, 2015, 10: e0129245.
- [6] Scalise A, Tortorella D, Pristeri A, et al. Legume-barley intercropping stimulates soil N supply and crop yield in the succeeding durum wheat in a rotation under rainfed conditions [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2015, 89: 150-161.
- [7] Flores-Sanchez D, Pastor A, Lantinga E A, et al. Exploring

- maize-legume intercropping systems in southwest Mexico [J]. *Agroecology and Sustainable Food Systems*, 2013, 37 (7): 739-761.
- [8] Fan F L, Zhang F S, Song Y N, et al. Nitrogen fixation of faba bean (*Vicia faba* L.) interacting with a non-legume in two contrasting intercropping systems [J]. *Plant and Soil*, 2006, 283 (1-2): 275-286.
- [9] Mia M A, Shamsuddin Z H. Rhizobium as a crop enhancer and biofertilizer for increased cereal production [J]. *African Journal of Biotechnology*, 2010, 9 (37): 6001-6009.
- [10] 黎健龙, 涂攀峰, 陈娜, 等. 茶树与大豆间作效应分析 [J]. *中国农业科学*, 2008, 41 (7): 2040-2047. (Li J L, Tu P F, Chen N, et al. Effects of tea intercropping with soybean [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2008, 41 (7): 2040-2047.)
- [11] Stephen W C. Biological nitrogen fixation [J]. *Nature Education Knowledge*, 2011, 2 (11): 14.
- [12] 张秋磊, 林敏, 平淑珍. 生物固氮及在可持续农业中的应用 [J]. *生物技术通报*, 2008(2): 1-4. (Zhang Q L, Lin M, Ping S Z. Biological nitrogen fixation and its application in sustainable agriculture [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2008(2): 1-4.)
- [13] Santi C, Bogusz D, Franche C. Biological nitrogen fixation in non-legume plants [J]. *Annals of Botany*, 2013, 111 (5): 743-767.
- [14] Herridge D F, Peoples M B, Boddey R M. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems [J]. *Plant and Soil*, 2008, 311 (1): 1-18.
- [15] Liu X J, Zhang F S. Nitrogen fertilizer induced greenhouse gas emissions in China [J]. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, 2011, 3 (5): 407-413.
- [16] Huang J X, Chen Y Q, Sui P, et al. Soil nitrous oxide emissions under maize-legume intercropping system in the north China plain [J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2014, 13 (6): 1363-1372.
- [17] Huang J X, Sui P, Nie S W, et al. Effect of maize-legume intercropping on soil nitrate and ammonium accumulation [J]. *Journal of Food Agriculture and Environment*, 2011, 9 (3-4): 416-419.
- [18] Flores-Sanchez D, Pastor A, Lantinga E A, et al. Exploring maize-legume intercropping systems in southwest Mexico [J]. *Agroecology and Sustainable Food Systems*, 2013, 37 (7): 739-761.
- [19] Wei G, Fan L, Zhu W, et al. Isolation and characterization of the heavy metal resistant bacteria CCNWR533-2 isolated from root nodule of *Lespedeza cuneata* in gold mine tailings in China [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 162 (1): 50-56.
- [20] Stan V, Cornea C P, Gament E, et al. Heavy metal resistant Rhizobium *leguminosarum biovar trifolii* isolates: Characterization and use in rhizoremediation of polluted soils [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2011, 22: S74.
- [21] Alves B J R, Boddey R M, Urquiaga S. The success of BNF in soybean in Brazil [J]. *Plant Soil*, 2003, 252 (1): 1-9.
- [22] Hungria M, Campo R J, Mendes D C. Reinoculation increasing soybean grain yield in Brazil [J]. *Biological Nitrogen Fixation, Sustainable Agriculture and the Environment*, 2005, 41: 315-315.
- [23] Hungria M, Franchini J C, Campo R J, et al. Nitrogen nutrition of soybean in Brazil: Contributions of biological N₂ fixation and N fertilizer to grain yield [J]. *Canadian Journal of Plant Science*, 2006, 86 (4): 927-939.
- [24] Alam F, Bhuiyan M A, Alam S S, et al. Effect of *Rhizobium* sp. BARIRGm901 inoculation on nodulation, nitrogen fixation and yield of soybean (*Glycine max*) genotypes in gray terrace soil [J]. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 2015, 79: 1660-1668.
- [25] Qin L, Zhao J, Tian J, et al. The high-affinity phosphate transporter GmPT5 regulates phosphate transport to nodules and nodulation in soybean [J]. *Plant Physiology*, 2012, 159 (4): 1634-1643.
- [26] 刘均霞, 陆引昱, 远红伟, 等. 玉米/大豆间作条件下养分的高效利用机理 [J]. *山地农业生物学报*, 2007, 26(2): 105-109. (Liu J X, Lu Y G, Yuan H W, et al. Studies on the efficient use of nutrients in maize/soybean intercropping [J]. *Journal of Mountain Agriculture and Biology*, 2007, 26 (2): 105-109.)
- [27] Israel D W. Investigation of the role of phosphorus in symbiotic dinitrogen fixation [J]. *Plant Physiology*, 1987, 84 (3): 835-840.
- [28] Schuize J, Adgo E, Merbach W. Carbon costs associated with N₂ fixation in *Vicia faba* L. and *Pisum sativum* L. over a 14 day period [J]. *Plant Biology*, 1999, 1 (6): 625-631.
- [29] 王树起, 韩晓增, 巧云发, 等. 缺磷胁迫对大豆根瘤生长和结瘤固氮的影响 [J]. *大豆科学*, 2009, 28 (6): 1000-1003. (Wang S Q, Han X Z, Qiao Y F, et al. Nodule growth, nodulation and nitrogen fixation in soybean (*Glycine max* L.) as affected by P deficiency stress [J]. *Soybean Science*, 2009, 28 (6): 1000-1003.)
- [30] Qin L, Jiang H, Tian J, et al. Rhizobia enhance acquisition of phosphorus from different sources by soybean plants [J]. *Plant and Soil*, 2011, 349 (1): 25-36.
- [31] Li X X, Zhao J, Tan Z Y, et al. *GmEXPB2*, a cell wall β -expansin, affects soybean nodulation through modifying root architecture and promoting nodule formation and development [J]. *Plant Physiology*, 2015, 169 (4): 2640-2653.
- [32] 高亚梅, 韩毅强, 王景伟, 等. 大豆根瘤菌的分离与分子鉴定 [J]. *黑龙江八一农垦大学学报*, 2007, 19 (5): 16-19. (Gao Y M, Han Y Q, Wang J W, et al. Isolation and molecular identification of soybean rhizobia [J]. *Journal of Heilongjiang August First Land Reclamation University*, 2007, 19 (5): 16-19.)
- [33] 程凤娴, 曹桂芹, 王秀荣, 等. 华南酸性低磷土壤中大豆根瘤菌高效菌株系的发现及应用 [J]. *科学通报*, 2008, 53 (23): 2903-2910. (Cheng F X, Cao G Q, Wang X R, et al. Discovery and application of effective soybean rhizobia strains line in low acid and phosphorus soil of Huanan [J]. *Science in China Press* 2008, 53(23): 2903-2910.)
- [34] 郑丹丹, 田琴, 周丹平, 等. 大豆根瘤菌抗性菌株的筛选及鉴定 [J]. *干旱地区农业研究*, 2012, 30 (6): 157-161. (Zheng D D, Tian Q, Zhou D P, et al. Screening and identification of the root nodule bacteria resistant stain associated with soybean [J]. *Agricultural Research in the Arid Areas*, 2012, 30 (6): 157-161.)
- [35] 卢林纲. 黑龙江省大豆根瘤菌复合颗粒肥的研制及其应用技术研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 2005. (Lu L G. Developing *Bradyrhizobium japonicum* mixed pellet fertilizer and its application in Heilongjiang province [D]. Beijing: China Agriculture University, 2005.)
- [36] Fujikake H, Yamazaki A, Ohtake N, et al. Quick and reversible inhibition of soybean root nodule growth by nitrate involves a decrease in sucrose supply to nodules [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2003, 54 (386): 1379-1388.